体外診断用医薬品
承認番号 21600AMZ00025000
※※区分：保険適用項目
D007-16：ALPアイソザイム

ご使用の前に本添付文書をよくお読みください

2013年11月改定（第5版） ※今回改訂
2012年3月改定（第4版）※※前回改訂

アルカリ性フォスファターゼアイソザイムキット

クイック ALP（QG）

Helena Laboratories

【全般的な注意】

1. 本製品は体外診断用であり、それ以外の目的に使用しないでください。
2. 診断は、他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断してください。
3. 添付文書以外の使用方法については保証を致しません。
4. 使用する機器の取扱説明書をよく読んでから使用してください。

【形状構造等（キットの構成）】

Cat.No.J867 クイック ALP (QG)（12枚用）

1. 基質剤 ……	1.5mL用	3本
3-インドキシルリン酸二ナトリウム塩	3.9mmol/L*	
2. 基質溶解液 ……	5mL	1本
3. 発色試液 ……	2.5mL	3本
NTB(ニトロテトラゾリウムブルー)	2.7mmol/L*	
4. 前処理剤 ……	1mL用	3本
プロテアーゼ	300U/mL*	

＊試薬調製後の終濃度

Cat.No.J868 クイック ALP (QG)（20枚用）

1. 基質剤 ……	2mL用	4本
3-インドキシルリン酸二ナトリウム塩	3.9mmol/L*	
2. 基質溶解液 ……	8mL	1本
3. 発色試液 ……	3mL	4本
NTB(ニトロテトラゾリウムブルー)	2.7mmol/L*	
4. 前処理剤 ……	1.5mL用	2本
プロテアーゼ	300U/mL*	

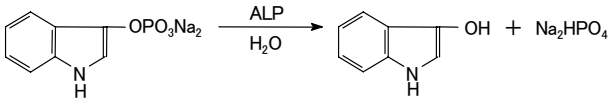
＊試薬調製後の終濃度

【使用目的】

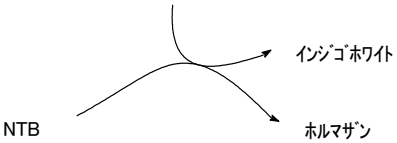
血清中のアルカリフォスファターゼ（ALP）アイソザイムの測定

【測定原理】

血清と前処理剤（プロテアーゼ）を反応させ、高分子サイズの小腸由来ALP（HIAP）を通常分子サイズの小腸由来ALP（NIAP）に変換する[1]。
アガロースプレートを支持体として、電気泳動法により血清中のALPアイソザイムを分離する。試薬を泳動後のアガロースプレートに含ませて反応させ、次の反応系から生成されたホルマザンを測定する。



3-インドキシルリン酸二ナトリウム塩　　3-ハイドロオキシインドール



【操作上の注意】

1. 測定試料の性質・採取法
   (1) 試料は血清とする。採血から血清分離までの操作は迅速に行い、分離操作後の試料は2～8℃の冷蔵庫に入れ、できるだけ早く測定する。やむを得ない場合は、凍結(-80～-20℃)で保存する。
   (2) 採血時期は早朝空腹時を原則とする（食後採血はALP5 の出現率を高めることがある）。
   (3) 試料の凍結、融解の繰り返しは避ける。

2. 妨害物質等
   (1) シュウ酸、クエン酸、EDTA、シアン化合物、高濃度のリン酸及びグリシンは、ALP活性を阻害する[2]。
   (2) 正常人血清においてもALP1 の陽極側にアルブミンの発色がみられることがある。

【用法・用量(操作方法)】

エパライザ2（蛋白分画電気泳動分析装置）で測定する場合

エパライザ2では、登録したパラメータに従い試料の塗布、電気泳動、試薬の展開・反応、測定、分画値の算出まで自動で行います。
機器の操作方法及び設定条件（泳動パラメータ）等の入力方法については取扱説明書を参照してください。

1. 使用試薬及び機器

(1) 試薬

		Cat.No.
クイック ALP (QG)	(12枚用)	J867
	(20枚用)	J868
クイックジェル ALP	(10枚入り)	J713
エパライザープレップ	(240mL×1本)	J416
	(240mL×4本)	J417
クイックジェル ALP固定液	(250mL×4本)	J850

(2) 使用機器

	Cat.No.
エパライザ2	J111
ピペット	

2. 電気泳動パラメータの確認
ホルダー番号割り当て画面を表示する。「泳動パラメータ確認とシーケンス番号の割り当て」の検査項目リストから『ALPアイソザイム』を選択し、パラメータの確認を行う。

処理動作	処理2
1列の検体数	10
塗布列	2
塗布位置	No.4(D320)
塗布回数	3
サンプリング時間 (mm:ss)	00:05
試料採取具合	ふつう
塗布時間 (mm:ss)	湿度で可変
---20%	01:20
20.1%---40%	01:40
40.1%---60%	02:20
60.1%---	03:00
泳動時間 (mm:ss)	23:00
泳動電圧(V)	230
泳動温度(℃)	15
冷風時間 (mm:ss)	04:00
試薬量(μL)	300
試薬番号	Mix
Mix 処理 試薬番号	3 and 4
試薬滴下回数	1
試薬展開数	20
染色時間 (mm:ss)	--:--
反応時間 (mm:ss)	24:00
反応温度 (℃)	45
脱色・固定液タイプ	脱色2
脱色・固定時間 (mm:ss)	12:30
注入時間 (mm:ss)	00:07
放置時間 (mm:ss)	01:00
排出時間 (mm:ss)	00:15
サイクル	10
乾燥時間 (mm:ss)	12:00
乾燥温度 (℃)	75

3. 試薬及び試料の準備

(1)試薬の調製

①基質剤を、バイアルラベルに記載された所定量の基質溶解液で溶解し、基質試液とする。2～8℃で遮光して保存する時、1 ヶ月間安定であるが、ピペット等による汚染に注意する。

②発色試液はそのまま使用する。

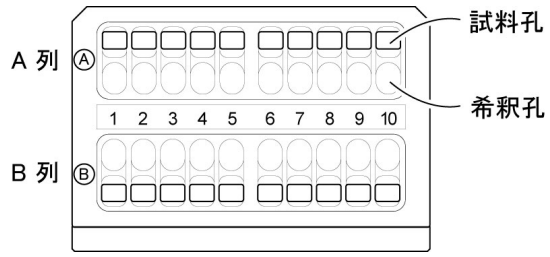
③試薬庫の試薬番号“3”の位置に発色試液、“4”の位置に基質試液、“Mix”の位置にミックスカップをセットする(基質試液と発色試液は、泳動終了時に自動的に等量混合され、反応試液となる)。

(2)前処理剤の調製

前処理剤を、バイアルラベルに記載された所定量の精製水で溶解し、前処理液とする。2～8℃で遮光して保存する時 1 ヶ月間安定であるが、ピペット等による汚染に注意する(溶解後速やかに 1 枚当たりの使用量に小分けし-20℃以下で凍結保存する時、バイアルに記載の有効期限まで使用可能である)。

(3)試料の準備 ※

前処理液6μLと試料30μLをサンプルプレートの試料孔A列1番から順に採り混合する。試料を採ったサンプルプレートと乾燥防止用プレートを重ね、室温で 30 分間以上反応させる。反応終了後、サンプルウェルプレート庫(未検査)にセットする(下から順に処理される)。



(4)反応停止液の準備

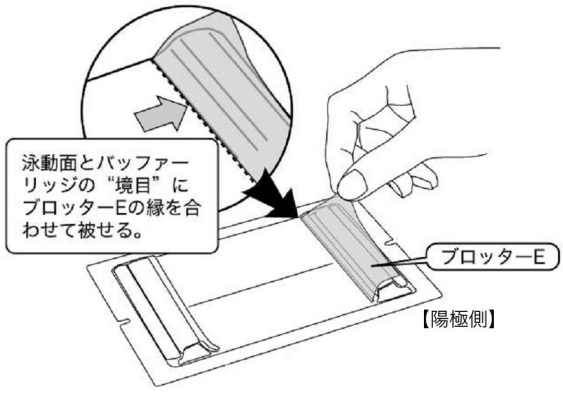
クイックジェル ALP固定液を精製水で 80 倍に希釈して反応停止液とし、脱色2容器に入れる(例:クイックジェル ALP固定液 10mL に精製水を加え 800mL にする)。

4. 支持体の準備

冷蔵で保存している場合は室温に戻してから操作を行ってください。

(1)必要な枚数分のクイックジェルALPをアルミ袋から取り出し、カセットからゆっくりと剥がす。1 枚目等、カセットから剥がして直ぐに使用する場合は付属のブロッターFを使用する。(泳動面にのせて表面の余分な水分を吸い取り、直ぐに取り除く)。

(2)陽極側のバッファーリッジに、ブロッターEを気泡が入らないように貼り付ける。



(3)アガロース面を下に向け、プレートホルダーにセットする。

(4)アガロース面を上に向け、プレートホルダーの番号を手前にしてホルダー庫にセットする(乾燥防止のため一番上にホルダーカバーを重ねる)。

5. 測定

(1)スタート前確認画面を表示する。検査項目『ALPアイソザイム』を選択し、画面に従って確認を行う。

(2)全ての準備が完了すると、スタートが表示されるので、クリックして検査を開始する(塗布から測定まで自動で行う)。

◇測定後のプレートを保存する場合

プレート両極のバッファーリッジを取り除き、6 分間イオン交換水に浸けた後に乾燥させて保存する(水洗いは、経時的にプレートのバックグラウンドが染まるのを防止する)。

エパライザ2 ジュニア（蛋白分画電気泳動分析装置）で測定する場合 ※

エパライザ 2 ジュニアでは、登録したパラメータに従い試料の塗布、電気泳動、試薬の展開・反応、測定、分画値の算出まで自動で行います。
機器の操作方法及び設定条件（泳動パラメータ）等の入力方法については取扱説明書を参照してください。

1. 使用試薬及び機器

（1）試薬

		Cat.No.
クイック ALP (QG)	(12 枚用)	J867
	(20 枚用)	J868
クイックジェル ALP	(10 枚入り)	J713
REP－prep	(240mL×1 本)	J409
	(240mL×4 本)	J3100
クイックジェル ALP固定液	(250mL×4 本)	J850

（2）使用機器

	Cat.No.
エパライザ2 ジュニア	J115
ピペット	

2. 電気泳動パラメータ

処理モード	処理3
1 列の検体数	10
塗布列	2
塗布位置	No.4 (DM104)
塗布回数	3
サンプリング時間 (mm:ss)	00:05
試料採取具合	ふつう
塗布時間 (mm:ss)	湿度で可変
－－－20%	01:20
20.1%－－－40%	01:40
40.1%－－－60%	02:20
60.1%－－－	03:00
泳動時間 (mm:ss)	23:00
泳動電圧(V)	230
泳動温度(℃)	15
冷風ファン	ON
冷風時間 (mm:ss)	湿度で可変
－－－20%	00:40
20.1%－－－40%	01:00
40.1%－－－60%	01:20
60.1%－－－	01:40
試薬展開数	12
試薬展開ローラ停止時間	0:01
試薬展開温度(℃)	45
反応時間 (mm:ss)	18:00
反応温度 (℃)	45
脱色・固定 注入時間 (mm:ss)	00:40
放置時間 (mm:ss)	01:20
排出時間 (mm:ss)	00:40
回数	4
ポンプ番号	3
乾燥時間 (mm:ss)	14:00
乾燥温度 (℃)	65

3. 試薬及び試料の準備

検査項目リストから『ALPアイソザイム』を選択し、「スタート前の準備」に従って準備を行う。

（1）試薬の調製

①基質剤を、バイアルラベルに記載された所定量の基質溶解液で溶解し、基質試液とする。2～8℃で遮光して保存する時、1 ヶ月間安定であるが、ピペット等による汚染に注意する。

②発色試液はそのまま使用する。

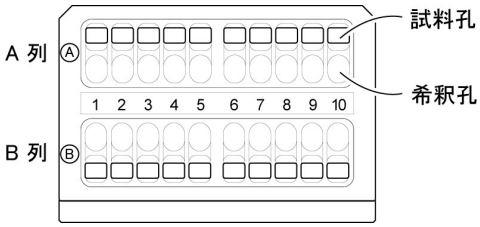
③基質試液と発色試液を試薬カップに 350μL ずつ採って混合し、反応試液とする。試薬台 2 番の穴にセットする。

（2）前処理剤の調製

前処理剤を、バイアルラベルに記載された所定量の精製水で溶解し、前処理液とする。2～8℃で遮光して保存する時 1 ヶ月間安定であるが、ピペット等による汚染に注意する（溶解後速やかに 1 枚当たりの使用量に小分けし-20℃以下で凍結保存する時、バイアルに記載の有効期限まで使用可能である）。

（3）試料の準備

前処理液6μLと試料30μLをサンプルプレートの試料孔A列1番から順に採り混合する。試料を採ったサンプルプレートと乾燥防止用プレートを重ね、室温で 30 分間以上反応させる。反応終了後、搬送台にセットする。



（4）反応停止液の準備

クイックジェル ALP固定液を精製水で80倍に希釈して反応停止液とし、ポンプ 3 容器に入れる（例:クイックジェル ALP固定液50mL に精製水を加え 4L にする）。

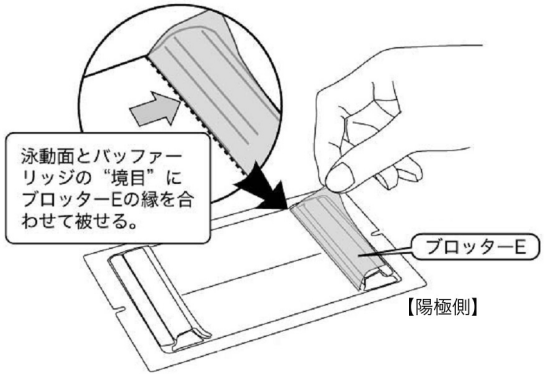
4. 支持体の準備

冷蔵で保存している場合は室温に戻してから操作を行ってください。

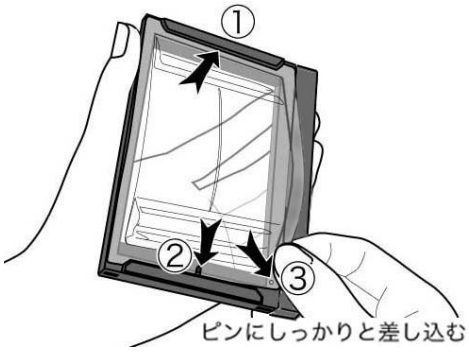
（1）REP－prep約 0.5mLをステーション1の冷却盤にのせる。

（2）クイックジェルALPをアルミ袋から取り出し、カセットからゆっくりと剥がす。付属のブロッターFを泳動面にのせて表面の余分な水分を吸い取り、直ぐに取り除く。

（3）陽極側のバッファーリッジに、ブロッターEを気泡が入らないように貼り付ける。



（4）アガロース面を下に向け、プレートホルダーにセットする。



（5）アガロース面を上に向けて冷却盤との間に気泡が入らない様にゆっくりと置く。

5. 測定

全ての準備が完了すると、スタートが表示されるので、クリックして検査を開始する（塗布から測定まで自動で行う）。

◇測定後のプレートを保存する場合

プレート両極のバッファーリッジを取り除き、6 分間イオン交換水に浸けた後に乾燥させて保存する（水洗いは、経時的にプレートのバックグラウンドが染まるのを防止する）。

用手法で測定する場合

機器及び器具の操作方法については取扱説明書を参照してください。

1. 使用試薬及び機器 ※

(1)試薬

		Cat.No.
クイック ALP (QG)	(12 枚用)	J867
	(20 枚用)	J868
クイックジェル ALP	(10 枚入り)	J713
REP－prep	(240mL×1 本)	J409
	(240mL×4 本)	J3100
メタノール		

(2)使用機器

	Cat.No.
クイックスキャン	J121
又はEDC	1376
I.O.D.	J160
タイタンプラス パワーサプライ	1504
クイックジェル チャンバー P	J678
又はクイックジェル チャンバー	J675
クイックジェル アプリケーター	J653
アプリケーターチップ	J636
サンプルプレート E2	J637
クイックジェル 試薬展開ローラー	J657
クイックジェル 湿潤箱	J4062
クイックジェル 染脱色容器	J656
展開板	J670
ピペット	

2. 測定操作法

試料量	30μL
塗布位置	3
塗布回数	3 回
泳動電圧	250V
泳動時間	20 分
泳動温度(電子冷却式チャンバー使用)	20℃
反応温度	37℃
反応時間	25 分
固定時間	5 分
水洗時間	20 分
測定波長(EDCでの測定時)	570nm

3. 準備 ※

(1)反応停止液の準備

70%(v/v)メタノールを調製し、染脱色容器に約 250mL 入れる(液温が下がってから使用すること)。

(2)I.O.D.の用意

I.O.D.を 37℃にセットして加温しておく。

(3)試薬の調製

①基質剤を、バイアルラベルに記載された所定量の基質溶解液で溶解し、基質試液とする。2～8℃で遮光して保存する時、1 ヶ月間安定であるが、ピペット等による汚染に注意する。

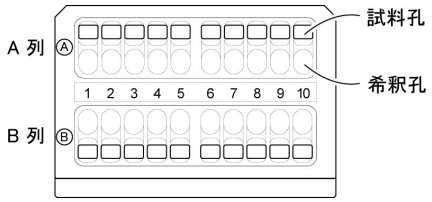
②発色試液はそのまま使用する。

(4)前処理剤の調製

前処理剤を、バイアルラベルに記載された所定量の精製水で溶解し、前処理液とする。2～8℃で遮光して保存する時 1 ヶ月間安定であるが、ピペット等による汚染に注意する(溶解後速やかに 1 枚当たりの使用量に小分けし-20℃以下で凍結保存する時、バイアルに記載の有効期限まで使用可能である)。

(5)試料の準備

前処理液6μLと試料30μLをサンプルプレートの試料孔A列1番から順に採り混合する。乾燥防止用プレートを重ね、室温で 30 分間以上反応させる。



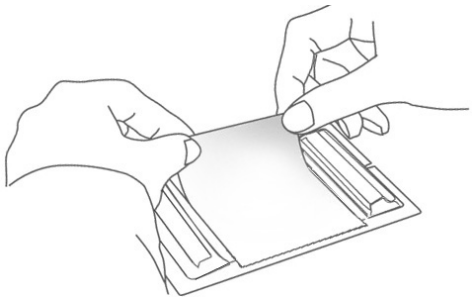
4. 電気泳動 ※

(1)クイックジェル チャンバー Pの電源を入れ、温度切替スイッチがOFFであることを確認する。

(2)クイックジェルとチャンバーの密着を良くするため、チャンバーの上に REP－prepを約0.5mLのせる。

(3)クイックジェルALPをアルミ袋から取り出してカセットからゆっくりと剥がし、陰極側(－)が左側になるようにチャンバーにセットする。チャンバーとの間に気泡が入らないようゆっくりと置き、余分なREP－prepはペーパータオル等で拭き取る。

(4)泳動面にブロッターFをのせ、表面のバッファーを吸い取る。均一に吸い取ったら直ぐに取り除く。



(5)クイックジェルアプリケーターの塗布位置を"3"に合わせる。

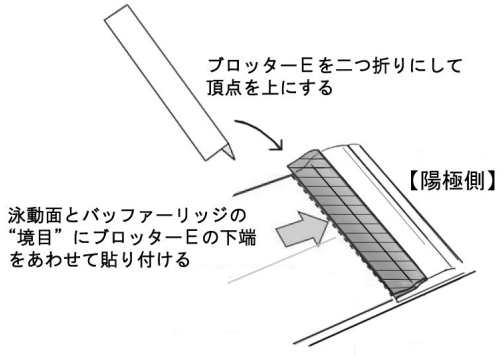
(6)アプリケーターに、試料を採取したサンプルプレートとアプリケーターチップをセットし、チャンバーにのせる。

(7)アプリケーターの取っ手を左に動かし、チップを試料に 5 秒間浸す。 取っ手を右に動かしてチップを引き上げ、さらに右に動かして試料を塗布する(チップを試料から引き上げる速さは塗布量に影響します。常に一定の速さで操作するように注意してください)。

(8)2 分間静置後、取っ手を左に動かしスタンバイ位置に戻す。この操作を繰り返し、3 回塗布する。

(9)アプリケーターをチャンバーから取り外す。

(10)ブロッターE を二つ折りにし、折り目の頂点を上にして陽極側のバッファーリッジ内側に貼り付ける。



(11)電極棒をセットしてチャンバーの蓋を閉め、温度切替スイッチを 20℃にする。温度が 20℃になったのを確認し、250V で 20 分間泳動する。

クイックジェル チャンバー(蓄冷剤式)を使用する場合
チャンバーに凍結した蓄冷剤をセットし、速やかに(2)以降の操作を行う。

◇泳動終了後、温度切替スイッチを OFF にする(または蓄冷剤を取り外す)。連続して泳動する場合は、チャンバーが室温に戻っていることを確認してから使用する。

5. 反応

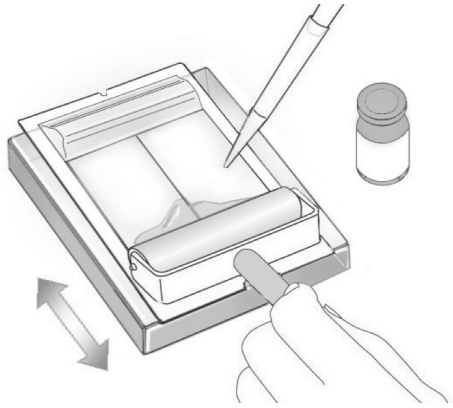
(1)泳動が終了する直前に、3.(3)で調製した基質試液と発色試液を300μLずつ採って混合し、反応試液とする。

(2)泳動終了後ブロッターEを取り除き、バッファーリッジに溶出したバッファーをペーパータオル等でそっと吸い取る。

(3)I.O.D.(37℃)にクイックジェルを入れ、扉を開けた状態で温風を2～3分間あてる。

(4)I.O.Dからクイックジェルを取り出し、展開板の上に置く。

(5)反応試液600μLをピペットに取り、泳動面の一極側から試薬展開ローラーを動かしながら滴下する。試薬が完全に吸収されるまで展開する(約10往復)。



(6)クイックジェルを展開板から剥がして湿潤箱に入れ、I.O.D.(37℃)で25分間反応させる。

6. 反応停止及び乾燥

(1)反応終了後、湿潤箱からクイックジェルを取り出し、3.(1)で調製した反応停止液に入れて5分間静置する。

(2)染脱色容器に水を約300mL入れ、クイックジェルを入れて20分間洗浄する(その間2～3回水を交換する)。

(3)洗浄後、プレート両極のバッファーリッジを取り除く。

(4)アガロース面を上にしてI.O.D.に入れ、50～60℃で完全に乾燥させる。

7. 測定

乾燥が終了した支持体をデンシトメーターで測定する。

(EDCで測定する場合は波長570nm)

【測定結果の判定法】

基準範囲(正常参考値)

222名の集団検診受診者、総活性が81～300U/L(2.7～10.0 K-A単位)の場合

	分画値
ALP2	35.8～74.0%
ALP3	25.1～59.0%
ALP5*	0.0～16.1%

この値を参考に、あらかじめ各施設で設定してください。

＊血液型B又はO型で分泌型の人では、ALP総活性値の上昇及びALP5の出現率が高くなることがあります[3]。また、高分子小腸ALPの泳動位置はALP3(骨型)と重なり誤差を与えますが、本キットは前処理剤(プロテアーゼ)で高分子小腸ALPを通常サイズの小腸ALPに変換して測定するため、骨型が正確に測定できます[1)4)]。

◇判定が困難なアノマリーバンドが出現することがあります。その場合は、各ALPアイソザイムがアミノ酸阻害や熱処理などに示す、異なった性質を利用して検索することができます(詳細は別紙「ALPアイソザイムの検索(QG)」を当社までご請求ください)。

【臨床的意義】

アルカリフォスファターゼ(Alkaline phosphatase, ALP, EC3.1.3.1)は、アルカリ性領域でリン酸エステルを加水分解する酵素である。

生体内では腎臓、肝臓、骨、小腸、胎盤などの組織でALP活性が高いことが知られ、これらの組織の生成亢進や肝胆道系の排出障害などにより、血清中のALP活性は上昇する。

血清中のALPは電気泳動法により、肝由来、骨由来、胎盤由来、小腸由来、高分子ALP(ALP1:分子量300,000以上)に分離することができる。また、胎盤性ALPと類似した性質を示す腫瘍産生ALPの存在も明らかにされ、Regan[5]、Nagao[6]アイソザイムが報告されている。その他に、免疫グロブリン[7]または脂質[8]との結合例、原発性肝癌に見られるKasahara[9]アイソザイムなどが報告されている。

【性能】

1. 感度
   精製水を試料として測定する時、ALPアイソザイム分画は検出されない。
   総活性80U/L(2.6K-A単位)±10%の検体を試料として測定する時、ALPアイソザイム分画が測定できる。また、単一の染色帯として、40U/L(1.3K-A単位)±10% から測定できる。
2. 正確性
   既知分画値*の管理用血清を測定する時、測定値は既知分画値の、ALP1が80.0～120.0%、ALP2が90.0～120.0%である。
   ＊5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸 *p*-トルイジン塩を基質として用いる方法
3. 同時再現性
   同一試料を20回同時に測定する時、分画値のCV値はALP2、ALP3とも5%以下である。
4. 測定範囲
   本キットにおけるALPアイソザイムの測定範囲は、総ALP活性80～1200U/L(2.6～40.0K-A単位)である。
5. 相関性
   本法と、タイタンALP－V*との相関性を検討したところ、回帰式及び相関係数rは以下の通りであった。
   ＊3-インドキシル酸ジ *p*-トルイジン塩を基質とする試薬

ALP1	Y= 0.99X+0.02	r= 0.996
ALP2	Y= 1.00X+0.69	r= 0.974
ALP3	Y= 1.03X-1.15	r= 0.976
ALP5	Y= 0.93X-0.32	r= 0.960

X: タイタンALP－V
Y: クイック ALP (n=117)

【使用上又は取扱上の注意】

1. 使用上の注意
   (1)有効期限の切れた試薬は使用しない。
   (2)試薬は冷蔵庫(2～8℃)で保存する。
   (3)ロットの異なる試薬を組み合わせて使用しない。また、同一ロットの試薬であっても試薬を注ぎ足すことは行わない。
   (4)クイックジェルALP1袋に、支持体が2枚入っている。開封後の未使用品は、アルミ袋に精製水0.5mLを注入した後セロハンテープ等で密封して所定の条件で保存し、2週間以内に使用する。
   (5)活性が測定範囲以上の血清は希釈して試料とする{希釈はサンプルプレートの希釈孔(最大50μL)を用いると便利である}。

2. 取扱上の注意
   (1)試料はHIV, HBV, HCV等の感染のおそれがあるものとして取扱う。
   (2)検査にあたっては感染の危険性をさけるため使い捨て手袋を着用する。
   (3)試薬が誤って目や口に入った場合には、水で十分洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けること。

3. 廃棄上の注意
   (1)廃液、使用済み器具などは感染性産業廃棄物として処理するか、次亜塩素酸ナトリウム(有効塩素濃度1000ppm、1時間以上浸漬)またはグルタルアルデヒド(2%、1時間以上浸漬)による消毒処理、あるいはオートクレーブ(121℃、20分間以上)による滅菌処理を行う。
   (2)試薬及び器具等を廃棄する場合は、「廃棄物の処理及び清掃に関する法律」に従った適正な処理を行う。

【貯蔵方法・有効期間】

1. 貯蔵方法　2～8℃で保存
2. 有効期間　12ヶ月(期限は外箱に表示)

【包装単位】

クイック ALP (QG)	(Cat.No.J867) 12枚用
	(Cat.No.J868) 20枚用

【主要文献】

1)松下誠, 他. アガロースゲル電気泳動法によるALPアイソザイム分析の改良. 臨床病理 52 補冊, 232(2004).
2)Young DS, et al. *Clin Chem* 21, 246D-248D(1975).
3)服部幸子, 他. ABO式血液型とLewis血液型別によるアルカリ性フォスファターゼ活性値とアイソザイム. 医学検査 49, 397(2000).
4)星野忠, 他. 臨床検査における汎用電気泳動支持体を用いた小腸様ALPおよび血液型依存性高分子小腸ALPの泳動位置についての再評価. 生物物理化学 42, 161-167(1998).
5)Fishman WH, et al. A serum alkaline phosphatase isoenzyme of human neoplastic cell origin. *Cancer Res* 28, 150-154(1968).
6)Nakayama T, et al. L-Leucine sensitive, heat-stable alkaline phosphatase isoenzyme detected in a patient with pleuritis carcinomatosa. *Clin Chim Acta* 30, 546-548(1970).
7)Nagamine M, Ohkuma S. Serum alkaline phosphatase isoenzymes linked to Immunoglobulin G. *Clin Chim Acta* 65, 39-46(1975).
8)鈴木武雄, 他. βγ領域に見られたALP, LAP, γ－GTPアイソエンザイムとリポ蛋白Xとの関連性について. 臨床検査 25, 1044-1048(1981).
9)Higashino K, et al. A hepatoma-associated alkaline phosphatase, the Kasahara isoenzyme compared with one of the isoenzymes of fl amnion cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 259, 337-346(1975).

【問い合わせ先】

株式会社 ヘレナ研究所　営業部又は薬品部
TEL 048(833)3208 FAX 048(833)3273

【製造販売元】
株式会社ヘレナ研究所
〒330-0061 埼玉県さいたま市浦和区常盤9-21-19
☎ 048-833-3208　FAX 048-833-3273
36158
1311(5)